



DCM013-11
Ed. 01/2015

TSH ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del TSH in siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO013

DESTINAZIONE D' USO

Il kit Diametra TSH ELISA viene utilizzato per la determinazione quantitativa dell'ormone stimolante la tiroide (TSH, tiotropina) nel siero o plasma umano. Il kit TSH ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'ormone stimolante la tiroide (TSH) è un ormone glicopolipeptidico sintetizzato e secreto dall'ipofisi anteriore, e regola la funzione endocrina della ghiandola tiroidea.

Il TSH consiste di due subunità, la subunità α è identica a quella della gonadotropina corionica umana (HCG), dell'ormone luteinizzante (LH), dell'ormone follicolo-stimolante (FSH); la subunità β è unica per il TSH e quindi ne determina la funzione.

La produzione di TSH è controllata dal Thyrotropin release hormone, (TRH), che è prodotto nell'ipotalamo ed è trasportato alla ghiandola pituitaria, in cui aumenta la produzione ed il rilascio di TSH. La somatostatina prodotta dall'ipotalamo ha, invece, un effetto opposto sulla produzione pituitaria di TSH, diminuisce o inibisce il relativo rilascio.

Il TSH stimola la ghiandola tiroidea inducendo la secrezione di tirossina (T4) e il triiodotironina (T3). Il rilascio di TSH è regolato dalla frazione libera circolante degli ormoni tiroidei nel sangue.

I livelli di TSH sono diminuiti quando le concentrazioni periferiche della frazione libera degli ormoni tiroidei sono alte. Per contro, livelli elevati di TSH sono presenti quando le concentrazioni periferiche degli ormoni tiroidei sono basse. Questo effetto genera un ciclo a feedback negativo.

I livelli di TSH sono misurati in pazienti sospetti di ipertiroidismo o ipotiroidismo, eccesso o carenza dell'ormone della tiroide. Livelli normali di TSH sono fra 0.3 e 3.0 mIU/mL, ma l'interpretazione dipende dai livelli degli ormoni tiroidei (T3 e T4).

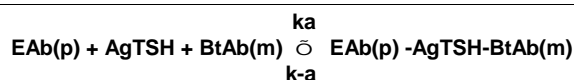
Livelli elevati di TSH uniti a livelli elevati degli ormoni tiroidei (T3 e T4) possono indicare una disfunzione dell'ipotalamo e della ghiandola pituitaria. In questo caso, livelli elevati di TSH sono prodotti spesso da un tumore benigno dell'ipofisi (adenoma). Per contro, livelli bassi di TSH e livelli bassi di T3 e T4 circolanti,

indicano ipopituitarismo. In caso di livelli anormalmente elevati di T3 e T4, dovuti alla sovrapproduzione nella tiroide, il meccanismo a feedback, descritto precedentemente, provoca bassi livelli di TSH. Ciò si presenta in malattie quali ipertiroidismo o la malattia di Grave. Per contro, un ipoproduzione di T3 e T4 causata da malattie quali ipotiroidismo congenito (cretinismo), ipotiroidismo o resistenza dell'ormone tiroideo, provoca un aumento nei livelli di TSH. Chiaramente sia TSH che T3 e T4 dovrebbero essere misurati per accertare quale specifica disfunzione della tiroide è causata dall'ipofisi o dalla tiroide.

2. PRINCIPIO DEL METODO

I requisiti essenziali per un saggio immunoenzimatico sono anticorpi ad alta affinità e specificità (enzima coniugato e immobilizzato), con differenti e distinti epitopi.

In questo metodo l'anticorpo si lega alla superficie del pozzetto attraverso l'interazione della streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi anti-TSH monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima; entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi. Nei pozzetti della micropiastra la reazione tra antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso sandwich solubile. L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtAb(m) = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

AgTSH = Antigene nativo (Quantità Variabile)

EAb(p) = Anticorpo Marcato con Enzima (in eccesso)

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) = Complesso Sandwich Antigene- Anticorpo

ka = Costante di Associazione

k-a = Costante di Dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad affinità tra la

Streptavidina e l' anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + Streptavidina CW. → Compl. immobilizzato

Streptavidina CW.= Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Compl. Immobilizzato = Legame sandwich Anticorpo-Antigene

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata all'anticorpo è separata dall'antigene non legato mediante decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

L'attività dell'enzima è quantificata mediante una reazione con un substrato che produce una colorazione.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (7 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/1306-0
CAL1	REF	DCE002/1307-0
CAL2	REF	DCE002/1308-0
CAL3	REF	DCE002/1309-0
CAL4	REF	DCE002/1310-0
CAL5	REF	DCE002/1311-0
CAL6	REF	DCE002/1312-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata nel Certificato di Analisi **REF DCE045/1303-0**

3. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo goat anti TSH coniugato a perossidasi di rafano (HRP), anticorpo mouse anti TSH biotinilato **REF DCE002/1302-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra coattata con streptavidina **REF DCE002/1303-0**

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE004-0**

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE005-0**

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare. Una volta aperta la micropiastra è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di TSH da 0,2 a 20,0 mIU/L.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso.

Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₆)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 2nd IRP 80/558 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
mIU/L	0	0,2	0,5	2,5	5,0	10	20

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti, i Calibratori sono stabili sei mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

La determinazione del TSH può essere effettuata su siero o plasma umano.

Il campione può essere conservato a 2-8°C per massimo due giorni. Per lunghi periodi di stoccaggio i campioni dovrebbero essere congelati. I campioni congelati devono essere agitate bene dopo lo scongelamento e prima del dosaggio. Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelamento.

Per campioni con concentrazione superiore a 20 mIU/L diluire il campione 1:2 con il Calibratore 0.

Correggere il risultato usando l'appropriato fattore di diluizione.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.

- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₆), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₆	50 µL		
Campione /Controllo		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Coprire la piastra e incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C). Per incrementare la sensibilità prolungare il tempo di incubazione a 120 minuti. Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti per 6 volte con 300 µL di Wash Solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Coprire la piastra ed incubare 20 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C) al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di TSH per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni

sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0 - C_6) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore (C_0 - C_6) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Cubic Spline o Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare i risultati sul grafico, leggendo i valori di concentrazione in mIU/L corrispondenti alle assorbanze di ciascun campione sulla curva disegnata.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Campioni di siero di donne e uomini sani sono stati saggiati utilizzando il Diametra TSH ELISA test, con i seguenti risultati:

	Media (mIU/L)	Range (mIU/L)
TSH	1,85	0,39 – 6,16

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 4,6%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (12x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 10,8%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 0,25 – 2,5 – 10 mIU/L di TSH, ha dato un valore medio (\pm SD) di 88,85% \pm 2,62%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di TSH misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,01 mIU/L con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

La cross-reattività della tirotropina ELISA verso sostanze selezionate è stata valutata aggiungendo sostanze interferenti al siero a concentrazioni differenti. La cross-reattività è stata calcolata mediante il rapporto tra la dose della sostanza interferente e la quantità di TSH necessaria a dare la stessa assorbanza.

Tirotropina (hTSH)	100 %
Tirotropina - alpha (hTSH-)	9,3 %
Tirotropina - beta (hTSH-)	152 %
Follitropina (hFSH)	1,0 %
Ormone luteinizzante(hLH)	1,0 %
GonadotropinaCorionica(hCG)	<0,1 %

10.5. Correlazione con altri dosaggi

Il kit Diametra TSH ELISA è stato comparato con due diversi kits disponibili in commercio. Sono stati testati 54 campioni di siero. Le curve di regressione sono:

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,96 \cdot (TSH \text{ CLIA}) + 0,06$$
$$r^2 = 0,972$$

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,87 \cdot (TSH \text{ Elisa}) + 0,29$$
$$r^2 = 0,971$$

10.6. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 500 mIU/L.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Hopton M. R, et al *Clinical Chemistry*, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. *Lancet*, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al *Clinical Chemistry* 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al *Clinical Chemistry* 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al *Eur. J. Endocrinol* 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, *Clinical Chemistry* 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., *Clinical Chemistry* 42: 135-139 (1996)

Ed. 01/2015

DCM013-11

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM013-11
Ed. 01/2015

TSH ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of TSH in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO013

INTENDED USE

Diametra TSH ELISA is an immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of thyroid-stimulating hormone (TSH, thyrotropin) concentration in human serum or plasma. TSH ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Thyroid-stimulating hormone (TSH or thyrotropin) is a glycopolypeptide hormone synthesized and secreted by the anterior pituitary gland which regulates the endocrine function of the thyroid gland.

TSH consists of two subunits, the *alpha* and the *beta* subunit. The α subunit is identical to that of human chorionic gonadotropin (HCG), luteinising hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH). The (*beta*) subunit is unique to TSH, and therefore determines its function.

TSH production is controlled by a Thyrotropin Releasing Hormone, (TRH), which is manufactured in the hypothalamus and transported to the pituitary gland, where it increases TSH production and release. Somatostatin is also produced by the hypothalamus, and has an opposite effect on the pituitary production of TSH, decreasing or inhibiting its release.

TSH stimulates the thyroid gland to secrete the hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3).

Release of TSH is regulated by the circulating free fraction of thyroid hormones in the blood. TSH levels are depressed when peripheral concentrations of the free fraction of thyroid hormones are high. Conversely, TSH levels are high when peripheral concentrations of thyroid hormones are low. This effect creates a regulatory negative feedback loop.

TSH levels are tested in the blood of patients suspected of suffering from excess (hyperthyroidism), or deficiency (hypothyroidism) of thyroid hormone. Generally, a normal range for TSH is between 0.3 and 3.0 mIU/mL, but the interpretation depends also on what the blood levels of thyroid hormones (T3 and T4) are.

Higher than normal levels of TSH combined with high levels of thyroid hormone (T3 and T4) may indicate dysfunction of the hypothalamus and pituitary gland. In these case, a high TSH is often produced by a benign

tumour of the pituitary (adenoma). Conversely, low levels of TSH, while blood levels of T3 and T4 are also low, indicates abnormally low function of the pituitary, known as hypopituitarism.

On the other hand, due to the negative feedback described above, abnormally high levels of Thyroid hormone, due to overproduction in the thyroid, results in low TSH levels. This occurs in diseases such as hyperthyroidism or Grave's disease. Conversely, an underproduction of T3 and T4 caused by diseases such as congenital hypothyroidism (cretinism), hypothyroidism or thyroid hormone resistance, gives rise to an increase in the measured TSH.

Clearly both TSH and T3 and T4 should be measured to ascertain where a specific thyroid disfunction is caused by primary pituitary or by a primary thyroid disease.

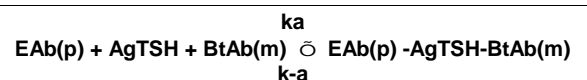
2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymatic assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this method, TSH calibrators, patient specimens and/or controls containing the native antigen are first added to streptavidin coated wells. Biotinilated monoclonal and enzyme labeled antibodies are added and the reactants mixed : these antibodies have high affinity and specificity and are detected against distinct and different epitopes of TSH.

Reaction between the various TSH antibodies and native TSH occurs in the microwells without competition or steric hindrance forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



BtAb(m) = Biotinilated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

AgTSH = Native Antigen (Variable Quantity)

EAb(p) = Enzyme labeled Antibody (Excess Quantity)

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

Ka = Rate Constant of Association

K-a = Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well though the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + Streptavidina CW. \Rightarrow Immobilized Complex

Streptavidin CW. = Streptavidin immobilized on well
Immobilized Complex = Antibodies-Antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantified by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (7 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/1306-0
CAL1	REF DCE002/1307-0
CAL2	REF DCE002/1308-0
CAL3	REF DCE002/1309-0
CAL4	REF DCE002/1310-0
CAL5	REF DCE002/1311-0
CAL6	REF DCE002/1312-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/1303-0

3. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Goat antibody anti TSH conjugated with horseradish peroxidase HRP; mouse antibody anti TSH biotinylated

REF DCE002/1302-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with streptavidin

REF DCE002/1303-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm).

Note

Store all reagents between 20-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close immediately after use. Once opened, the microplate is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of TSH from 0.2 mIU/L to 20.0 mIU/L.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are

needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₆)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against WHO 2nd IRP 80/558 and have the following concentrations of TSH:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
mIU/L	0	0.2	0.5	2.5	5.0	10	20

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the calibrators are stable six months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of the Sample

TSH assay can be performed in human serum or plasma.

Specimens may be stored at 2-8°C for maximum two days. For longer storage, specimens should be frozen. Frozen specimens should be well mixed after thawing, and before assay. Avoid repeated freezing and thawing.

Serum samples with TSH concentrations greater than 20mIU/L should be diluted 1:2 with C₀. Correct the result using an appropriate dilution factor.

The Control is ready to use.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.

- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₆), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₆	50 µL		
Sample/Control		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Cover the plate and incubate for 60 minutes at room temperature (22±28°C). To increase the sensibility read the absorbance after 120 min of incubation. Remove the content from each well; wash the wells 6 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature (22±28°C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the plate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of TSH for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₆) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C₀-C₆) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es:Cubic Spline or Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in mIU/L.

9. REFERENCE VALUES

Serum samples of apparently healthy women and men were assayed using the TSH ELISA test, with the following results:

	Mean (mIU/L)	Range (mIU/L)
TSH	1.85	0.39 – 6.16

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (16x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is 4.6%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (12x) of three different control sera in different lots of kit. The between assay variability is 10.8%.

10.2. Accuracy

The recovery of 0.25 – 2.5 – 10 mIU/L of TSH added to sample gave an average value (±SD) of 85.85% ± 2.62% with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of TSH that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.01 mIU/L with a confidence limit of 95%.

10.4. Specificity

The cross-reactivity of the thyrotropin ELISA method to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated

by the ratio between the dose of the interfering substance and the amount of TSH needed to obtain the same absorbance.

Thyrotropin (hTSH)	100 %
Thyrotropin - alpha (hTSH-)	9.3 %
Thyrotropin - beta (hTSH-)	152 %
Follicle-Stimulating Hormone (hFSH)	1.0 %
Luteinising hormone (hLH)	1.0 %
Chorionic Gonadotropin (hCG)	<0.1 %

10.5. Correlation with CLIA

Diametra TSH ELISA was compared with two others commercially available TSH assays. 54 serum samples were tested.

The two linear regression curves were calculated:

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0.96 * (TSH \text{ CLIA}) + 0.06$$

$$r^2 = 0.972$$

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0.87 * (TSH \text{ Elisa}) + 0.29$$

$$r^2 = 0.971$$

10.6. Hook Effect

Diametra TSH ELISA, a competitive enzyme immunoassay, shows no Hook Effect up to 500 mIU/L.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Hopton M. R, et al *Clinical Chemistry*, 32, 691 (1986)
- Caldwell, G. et al. *Lancet*, I, 1117, (1985)
- Young, D. S, et al *Clinical Chemistry* 21, 3660 (1975)
- Spencer, CA, et al *Clinical Chemistry* 41, 367 (1995)
- Beck-Peccoz P, et al *Eur. J. Endocrinol* 131: 331-340 (1994)
- Bravemann, L. E, *Clinical Chemistry* 42: 174-181 (1996)
- Fisher, D. A., *Clinical Chemistry* 42: 135-139 (1996)

Ed. 01/2015

DCM013-11

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15 –
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39.02.2139184;
Fax +39.02.2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)
Italy
Tel. +39.0742.24851;
Fax +39.0742.316197
E-mail: info@diametra.com



DCM013-11
Ed. 01/2015

TSH ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de TSH en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO013

USO PREVISTO

El ensayo TSH ELISA se usa para la determinación cuantitativa de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, tirotropina) en suero o plasma humano.

El kit TSH ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La hormona estimulante de la tiroides (TSH o tirotropina) es una hormona glicopéptida sintetizada y secretada por la hipófisis anterior y regula la función endocrina de la glándula tiroides.

La TSH está formada por dos subunidades: la subunidad α es idéntica a la de la gonadotropina coriónica humana (HCG), la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH); la subunidad β es única para la TSH y, por lo tanto, determina su función.

La producción de TSH se controla por la hormona de liberación de tirotropina (TRH), que se produce en el hipotálamo y es transportada a la glándula pituitaria, en la que aumenta la producción y la liberación de TSH. Sin embargo, la somatostatina producida por el hipotálamo tiene un efecto opuesto en la producción pituitaria de TSH, puesto que disminuye o inhibe su liberación.

La TSH estimula la glándula tiroides induciendo la secreción de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). La liberación de TSH está regulada por la fracción libre circulante de hormonas tiroideas en la sangre.

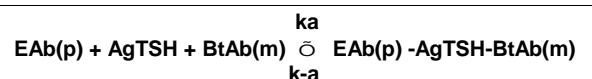
Los niveles de TSH disminuyen cuando las concentraciones periféricas de la fracción libre de hormonas tiroideas son altas. Por el contrario, se presentan niveles altos de TSH cuando las concentraciones periféricas de las hormonas tiroideas son bajas. Este efecto genera un ciclo de retroalimentación negativa.

Los niveles de TSH se midieron en pacientes con sospecha de hipertiroidismo o hipotiroidismo, exceso o carencia de la hormona tiroidea. Los niveles normales de TSH se encuentran entre 0,3 y 3,0 mIU/mL, pero la interpretación depende de los niveles de las hormonas tiroideas (T3 y T4).

Niveles elevados de TSH junto con niveles elevados de las hormonas tiroideas (T3 y T4) pueden indicar una disfunción del hipotálamo y de la glándula pituitaria. En este caso, los niveles altos de TSH se producen a menudo por un tumor benigno hipofisario (adenoma). Por el contrario, niveles bajos de TSH y niveles bajos de T3 y T4 circulantes indican hipopituitarismo. En caso de niveles anormalmente elevados de T3 y T4, debidos a la sobreproducción en la tiroides, el mecanismo de retroalimentación, descrito anteriormente, provoca bajos niveles de TSH. Así se presenta en enfermedades como el hipertiroidismo o la enfermedad de Graves. Por el contrario, una baja producción de T3 y T4 causada por enfermedades como el hipotiroidismo congénito (cretinismo), hipotiroidismo o resistencia de la hormona tiroidea, provoca un aumento de los niveles de TSH. Claramente, se deben medir ya sea la TSH o T3 y T4 para determinar qué disfunción tiroidea específica es causada por la hipófisis o por la tiroides.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los requisitos esenciales para un ensayo inmunoenzimático son anticuerpos de alta afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados), con epítopos distintos. En este procedimiento, el anticuerpo se une a la superficie del pocillo mediante la interacción de la estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-TSH monoclonales biotinilados o bien anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítopos distintos. En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble. La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtAb(m) = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

AgTSH = antígeno nativo (cantidad variable)

EAb(p) = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpo

ka = constante de asociación

k-a = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + estreptavidina CW. ⇒ Compl. inmovilizado

Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Compl. inmovilizado = enlace sándwich anticuerpo-antígeno

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante un lavado. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración.

Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (7 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0 **REF DCE002/1306-0**

CAL1 **REF DCE002/1307-0**

CAL2 **REF DCE002/1308-0**

CAL3 **REF DCE002/1309-0**

CAL4 **REF DCE002/1310-0**

CAL5 **REF DCE002/1311-0**

CAL6 **REF DCE002/1312-0**

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/1303-0

3. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo cabra anti TSH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP); anticuerpo ratón anti TSH biotinilado

REF DCE002/1302-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Una microplaca recubierta con estreptavidina

REF DCE002/1303-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota

Conservar todos los reactivos a 2÷8°C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de TSH de 0,2 a 20,0 mIU/L

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren

a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.

- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₆)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente a WHO 2^a IRP 80/558, y tienen las siguientes concentraciones de TSH:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
mIU/L	0	0,2	0,5	2,5	5,0	10	20

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses a 2-8°C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación de la muestra

La determinación de TSH puede realizarse en suero o plasma humano.

Si la prueba no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a -20 °C.

Para almacenamientos largos, congelar las muestras. Las muestras congeladas deben agitarse bien tras descongelarse y antes de la dosificación. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Para muestras con una concentración superior a 20 mIU/L, diluir 1:2 la muestra con Calibrador 0. Corregir el resultado usando el factor de dilución correspondiente.

El Control está listo para usar.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₆), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra /Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₆	50 µL		
Muestra /Control		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	

Cubrir la placa y incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (22±28°C). Para aumentar la sensibilidad, prolongar el tiempo de incubación a 120 minutos.

Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos seis veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Cubrir la placa y incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22±28°C). Protegida de la luz.

Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Agitar con cuidado para mezclar las soluciones. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de TSH para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis.

Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_6) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada Calibrador (C_0 - C_6) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos Calibrador (p. ej.: modelo spline cúbico o modelo logístico de 4 parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar a la curva las concentraciones de TSH correspondientes al control y a las muestras.

9. VALORES DE REFERENCIA

Las muestras de suero en mujeres y hombres sanos se han analizado utilizando el TSH IEMA TEST con los siguientes resultados:

	Media (mIU/L)	Rango (mIU/L)
TSH	1,85	0,39 – 6,16

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 4,6%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (12x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 10,8%.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 0,25 – 2,5 – 10 mIU/L de TSH ha dado un valor medio (\pm SD) de 88,85% \pm 2,62%.

10.3. Sensibilidad

Tomando como base los resultados de la determinación del valor del Calibrador 0 de 16 réplicas, la concentración mínima medible con este método es de 0,01 mIU/L con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

La reactividad cruzada de la tirotropina ELISA a las sustancias seleccionadas se estimó mediante la adición de sustancias interferentes al suero en concentraciones distintas. La reactividad cruzada se calculó evaluando la relación entre la dosis de la sustancia interferente y la cantidad de TSH necesaria para producir la misma absorbancia.

Tirotropina (hTSH)	100 %
Tirotropina - alfa (hTSH-)	9,3 %
Tirotropina - beta (hTSH-)	152 %
Folitropina (hFSH)	1,0 %
Hormona luteinizante (hLH)	1,0 %
Gonadotropina coriónica (hCG)	<0,1 %

10.5. Correlación con otros métodos

El kit TSH ELISA (Diametra) se ha comparado con dos kits distintos disponibles en el mercado. Se han comprobado 54 muestras de suero.

Las curvas de regresión son:

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,96*(TSH \text{ CLIA})+0,06$$

$$r^2 = 0,972$$

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,87*(TSH \text{ Elisa}) + 0,29$$

$$r^2 = 0,971$$

10.6. Efecto gancho

En este método no se ha observado efecto gancho hasta 500 mIU/L.

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hopton M. R, et al *Clinical Chemistry*, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. *Lancet*, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al *Clinical Chemistry* 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al *Clinical Chemistry* 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al *Eur. J. Endocrinol* 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, *Clinical Chemistry* 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., *Clinical Chemistry* 42: 135-139 (1996)

Ed. 01/2015

DCM013-11

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs